



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MANIPULAÇÃO TÉRMICA EMBRIONÁRIA E DIFERENTES NÍVEIS DE
TREONINA NA RESPOSTA DE FRANGOS LABEL ROUGE DESAFIADOS COM
SALMONELLA ENTERITIDIS

Alessandra Reigada Eliezer Gomes de Azevedo

Zootecnista

Areia - PB

Agosto - 2016

ALESSANDRA REIGADA ELIEZER GOMES DE AZEVEDO

MANIPULAÇÃO TÉRMICA EMBRIONÁRIA E DIFERENTES NÍVEIS DE
TREONINA NA RESPOSTA DE FRANGOS LABEL ROUGE DESAFIADOS COM
SALMONELLA ENTERITIDIS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, da Universidade
Federal da Paraíba, Centro de
Ciências Agrárias, como parte
das exigências para obtenção do
título de Mestre em Zootecnia.

Comitê de Orientação:

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Emília Naves Givisiez – Orientadora Principal

Prof. Dr. Edilson Paes Saraiva

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Areia – PB

Agosto de 2016

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

A994m Azevedo, Alessandra Reigada Eliezer Gomes de.

Manipulação térmica embrionária e diferentes níveis de treonina na resposta de frangos Label Rouge desafiados com *Salmonella enteritidis* / Alessandra Reigada Eliezer Gomes de Azevedo. - Areia: UFPB/CCA, 2016.

xi, 43 f. ; il.

*Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.*

Bibliografia.

Orientadora: Patrícia Emília Naves Givisiez.

1. Frangos Label Rouge – Manipulação embrionária 2. Frango caipira – Níveis de treonina 3. Nutrição de aves – Salmonella enteritidis I. Givisiez, Patrícia Emília Naves (Orientadora) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 636.5(043.3)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Manipulação térmica embrionária e diferentes níveis de treonina na resposta de frangos Label Rouge desafiados com *Salmonella enteritidis*”

AUTORA: Alessandra Reigada Eliezer Gomes de Azevedo

ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez
Presidente
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Gilson Mendes Araújo
Examinador
Instituto Federal do Piauí

Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Arcia, 31 de agosto de 2016

À minha família e à todos que colaboraram
na realização deste trabalho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar força para vencer todos os obstáculos e realizar meus sonhos.

Agradeço à minha mãe Luciana, pelo exemplo de vida, pelo amor, carinho, e por ser a minha fortaleza. Meu padrasto José Lidonor, meu pai André Luiz, à minha irmã Marcela, meu cunhado Jorge, ao meu sobrinho Gabriel, por todo amor, incentivo e carinho que foram cruciais para realização de mais um sonho.

Agradeço também à minha orientadora professora Patrícia, pela paciência, por acreditar e não desistir de mim, por ser um exemplo de profissional a quem eu possa me espelhar. À minha equipe de laboratório, Alexandre, Heraldo, Fátima, Adriano, Paulo, Albeiza, Sabrina, Eudes, Yohana, Júnior e Thaiano, pessoas fundamentais para que este trabalho pudesse ser realizado, incluindo Cristina, Élcio, Maurina, Candice, Silvana, Andréia e Mauro.

Aos Professores, Edilson, Leonardo, Ricardo, Celso, Fernando Guilherme, Walter, Paulo Sérgio, Gilson e Oliveira, que também foram imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos e colegas da universidade que me ajudaram e incentivaram, em especial Elizabete Macena e Severino Guilherme.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma participaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTAS DE TABELAS..... | vii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 2.1 Linhagem Label Rouge..... | 13 |
| 2.2 Importância da mucosa intestinal..... | 13 |
| 2.3 Salmonella Enteritidis..... | 15 |
| 2.4 Treonina..... | 17 |
| 2.5 Manipulação térmica durante a incubação..... | 18 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 Parâmetros de Incubação..... | 20 |
| 3.2 Eclosão e instalações..... | 20 |
| 3.3 Dietas experimentais..... | 21 |
| 3.4 Preparação do inóculo e inoculação..... | 22 |
| 3.5 Análise de desempenho..... | 22 |
| 3.6 Análise microbiológica..... | 23 |
| 3.7 Análise morfométrica..... | 23 |
| 3.8 Análise sanguínea..... | 24 |
| 3.9 Análise estatística..... | 24 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 37 |
| REFERÊNCIA..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Composição nutricional das dietas experimentais (continua) | 21 |
| Tabela 1. | Composição nutricional das dietas experimentais (conclusão) | 22 |
| Tabela 2. | Parâmetros de incubação de ovos férteis da linhagem Label Rouge incubados em diferentes temperaturas..... | 25 |
| Tabela 3. | Desempenho produtivo de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n=20 para temperaturas de incubação e n=30 para níveis de treonina)..... | 26 |
| Tabela 4. | Desdobramento das interações de peso final (g) e ganho de peso (g) de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n=20 para temperaturas de incubação e n=30 para níveis de treonina) | 27 |
| Tabela 5. | Contagem bacteriana do conteúdo cecal (Log10 UFC/g) de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade | 28 |
| Tabela 6. | Altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta (VC) do intestino delgado de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados ou não com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade (continua)..... | 30 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 6. | Altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta (VC) do intestino delgado de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados ou não com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade (conclusão)..... | 31 |
| Tabela 7. | Desdobramento das interações de altura de vilosidade (exceto duodeno), profundidade de cripta e relação vilo:cripta (V:C) do intestino delgado de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade | 34 |
| Tabela 8. | Contagem de heterófilos, linfócitos e relação heterófilo:linfócito (H:L) de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis aos dois dias de idade..... | 36 |

MANIPULAÇÃO TÉRMICA EMBRIONÁRIA E DIFERENTES NÍVEIS DE
TREONINA NA RESPOSTA DE FRANGOS LABEL ROUGE DESAFIADOS COM
SALMONELLA ENTERITIDIS

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da manipulação térmica embrionária e níveis de treonina sobre a resposta de frangos Label Rouge desafiados com *Salmonella* Enteritidis. A pesquisa foi realizada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Município de Areia-PB. Foram utilizados 240 ovos provenientes de matrizes reprodutoras da linhagem Label Rouge. Os ovos foram pesados e distribuídos em três incubadoras artificiais, sendo oitenta ovos em cada. Do primeiro ao décimo primeiro dia de incubação, todos os ovos foram mantidos em condições normais de incubação com temperatura de 37,7°C e umidade relativa de 60%, com viragem a cada duas horas. A partir do 11º dia, os ovos foram divididos em três tratamentos: baixa temperatura de incubação (36,7°C), temperatura ideal de incubação (37,7°C) e alta temperatura de incubação (38,7°C). Após a eclosão, os pintinhos foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2+1 [três temperaturas de incubação x dois níveis de treonina (0,857 e 0,956%) + grupo testemunha]. Aos dois dias de idade, todos os pintinhos foram inoculados pela via intra-esofágica com 0,5mL da cultura de *S. Enteritidis* ($1,9 \times 10^7$ UFC/mL), exceto os animais do grupo testemunha. No oitavo dia após a inoculação (8dpi) ou dez dias de idade, todos os animais foram pesados e eutanasiados para colheita de amostras. Avaliou-se o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros de incubação, desempenho, colonização cecal por *S. Enteritidis*, morfometria intestinal e contagem diferencial de células sanguíneas. Foi observado que a alta temperatura de incubação associada ao nível elevado de treonina amenizaram os efeitos negativos da *Salmonella* Enteritidis no desempenho, na morfometria do intestino delgado, na colonização e número de pintinhos infectados.

Palavras-chave: Aminoácido. Frango caipira. Intestino delgado. Nutrição. Patógenos.

EMBRIONIC THERMAL MANIPULATION AND THREONINE DIETARY LEVEL
ON THE RESPONSE OF LABEL ROUGE BIRDS INOCULATED WITH
SALMONELLA ENTERITIDIS

ABSTRACT

The effects of thermal manipulation during incubation and dietary threonine levels on Label Rouge birds challenged with *Salmonella* Enteritidis were assessed in the present study. Two hundred and forty fertile eggs of Naked Neck birds were weighed and distributed in three artificial incubators set to 37.7 °C and 60% of relative humidity. At the eleventh day of incubation (DE11), the temperature of the incubators were set to one of the following treatments: cold (36.7°C), standard (37.7°C) and high incubation temperature (38.7°C). After hatching the birds were distributed according to a 3x2+1 factorial (three incubation temperatures, two threonine levels and sham control). Two-day old chicks were inoculated with *S. Enteritidis* (1.9×10^7 UFC/mL), except for the sham control birds. Eight days after inoculation, all birds were weighed and slaughtered for sampling. High incubation temperature and high threonine levels improved the response of birds to *Salmonella* Enteritidis, as shown by improved performance and intestinal integrity, lower colonization and number of infected birds.

Keywords: Amino acid. Naked neck. Nutrition. Pathogen. Small intestine.

1 INTRODUÇÃO

A atividade avícola tem se destacado cada vez mais no agronegócio brasileiro. Em decorrência desta evolução, estratégias nutricionais associadas a parâmetros ambientais vêm sendo desenvolvidas no intuito de aprimorar cada vez mais a produção de frangos sem comprometer seu bem-estar. Segundo Takahashi (2003), a criação alternativa de frangos de corte tem evoluído nos últimos anos, tornando-se uma atividade economicamente viável para pequenas propriedades rurais que podem explorar este nicho de mercado com produtos diferenciados.

A linhagem Label Rouge tem sido muito utilizada como produção alternativa, principalmente por possuírem um diferencial, a ausência de penas no pescoço. Isto permite que haja aumento na eficiência do gradiente térmico para a perda de calor com o ambiente, as tornando mais resistentes a esse tipo de estresse quando comparadas com as aves que possuem penas nessa região.

Diversas técnicas de manejo nutricional têm sido recomendadas como formas de amenizar efeitos maléficos que o estresse térmico causa sobre a produção avícola. O estresse prejudica o desempenho do animal, pois parte da energia ingerida precisa ser direcionada para a manutenção da homeostase corporal. A indução de termotolerância foi sugerida como prática de manejo para melhorar a resposta fisiológica das aves ao estresse térmico, pois a indução de termotolerância não apenas aumentaria a resistência ao estresse térmico, como também a resistência a outros tipos de estresse (STAR et al., 2009). A exposição de animais durante o período embrionário ou ao nascer tem resultado, aparentemente, em maior habilidade para resistir ao estresse quando estes estão mais velhos. A conjugação de fatores favoráveis extrínsecos (técnicas de manejo e nutrição) e intrínsecos (termotolerância) provavelmente possibilitaria respostas mais efetivas, evitando-se perdas na produção.

Outro grande desafio é a sanidade avícola, que com a intensificação da produção, as aves tornaram-se mais susceptíveis a maior contaminação por agentes patogênicos, como a *Salmonella*, que causam modificações no trato gastrointestinal com consequente queda no desempenho animal, ocasionando prejuízo econômico para cadeia de produção avícola. Gast (2003) ressalta que *Salmonella* é um agente patogênico com distribuição mundial, apresentando prejuízos elevados causado pela alta mortalidade, e queda na produção, além de apresentar problemas referentes à saúde pública. Nos Estados Unidos da América e também no Brasil, a *Salmonella* é o

patógeno responsável pela maioria das intoxicações de origem alimentar em humanos, sendo que a *Salmonella* Enteritidis está entre as espécies de maior ocorrência devido ao consumo de carne e ovos contaminados, assim como de seus derivados (SILVA et al., 2003). Uma das formas de proteção contra *Salmonella* spp. e outros agentes entéricos é, em parte, dada pela camada de muco presente no intestino (OVIEDO-RONDÓN, 2006).

Segundo Oviedo-Rondón (2006), a treonina é o aminoácido essencial mais amplamente usado pelo metabolismo intestinal, podendo ser uma alternativa viável na melhoria da resposta de aves a patógenos por estar intimamente relacionada com a produção de mucinas, formando uma barreira de proteção contra a ação de enzimas digestivas e dano físico da digesta (FAURE et al., 2007).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito manipulação térmica embrionária e nível elevado de treonina na resposta de frangos Label Rouge desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Linhagem Label Rouge

No Brasil, as elevadas temperaturas durante a maior parte do ano são um fator limitante a produção de aves, visto que estas não possuem glândulas sudoríparas para auxiliá-las no processo de perda de calor diante de situações de estresse por calor. Procurando contornar esse problema, a indústria avícola tem desenvolvido genótipos de alto rendimento e adaptados a elevadas temperaturas (SHARIFI et al. 2010).

Dentre as linhagens caipiras utilizadas na produção avícola, a maioria possui uma camada de penas na região do pescoço, que funciona como isolante térmico e as desfavorece no processo de dissipação de calor com o ambiente (LIN et al., 2006). Assim, o desenvolvimento das linhagens de “pescoço pelado”, disponibilizou no mercado avícola aves mais tolerantes ao calor. A presença do gene *Na* determina o aumento da área descoberta de penas, facilitando a transferência térmica sensível, e assim, tornando estas aves mais tolerantes ao calor (SILVA et al., 2001).

Uma das linhagens de pescoço pelado que é bastante utilizada no Brasil é a Label Rouge, a qual é considerada por alguns como uma galinha caipira. Ela foi desenvolvida na França a partir do cruzamento de raças rústicas, é uma ave versátil, que tem uma boa produção de ovos e de carne bastante apreciada. A palavra Label Rouge significa “selo vermelho”, que foi criado em 1965 para garantir um produto de qualidade tanto no paladar quanto nas condições de produção, processamento e comercialização (SOUZA JÚNIOR, 2012). Essas características conferem a linhagem Label Rouge alta capacidade produtiva associada à adaptação às condições de estresse por calor.

2.2 Saúde intestinal

O intestino é o principal local de digestão e absorção de nutrientes das aves, cuja integridade e funcionalidade afetam diretamente no crescimento e expressão de seu potencial genético. Ele é dividido em dois principais segmentos: em intestino delgado e intestino grosso. O intestino delgado é a porção mais longa do sistema digestório, compreendido pelo duodeno, jejuno e íleo, regiões em que ocorrem os principais processos de digestão enzimática e absorção de nutrientes. O intestino grosso é o

segmento subsequente ao intestino delgado, formado pelas regiões dos cecos e cólon. Apresenta maior funcionalidade dos processos fermentativos das aves, no entanto, e essa propriedade é de pouca relevância na aquisição de energia destes animais.

O trato digestório da ave tem seu desenvolvimento iniciado com 18 horas de incubação. Ao décimo oitavo dia, começa o mecanismo fisiológico da absorção do saco da gema, fenômeno que dá origem ao desenvolvimento da mucosa intestinal. Segundo Maiorka (2002), assim que o pintinho nasce, seu sistema digestório ainda não possui a mesma capacidade funcional de digestão e absorção quando comparado ao de uma ave adulta.

Os primeiros dias de vida dos pintinhos são caracterizados por uma importante transição metabólica e fisiológica em função da troca da alimentação dos nutrientes do saco vitelínico (com alto teor de gordura) para um alimento exógeno (com alto teor de carboidratos e proteínas) (UNI; FERKET, 2004). Desde então, a ingestão de alimento torna-se o principal fator desencadeador do crescimento das vilosidades e maturidade funcional das células intestinais. As alterações morfológicas intestinais mais significativas são: aumento no comprimento do intestino e aumento na altura e densidade dos vilos, o que corresponde a um aumento em números de suas células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas) (MACARI et al., 2002).

As vilosidades revestem a parede intestinal e proporcionam maior área de contato entre nutrientes e mucosa, permitindo digestão e absorção mais eficientes. Os vilos são constituídos por três tipos de células: enterócitos, células caliciformes e as células enteroendócrinas (MAIORKA, 2004). Os enterócitos são células que respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte dos nutrientes a partir do lúmen. As células caliciformes são responsáveis pela síntese de mucina, a qual tem a função de proteger o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. As células enteroendócrinas são produtoras de hormônios e substâncias que participam na regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes (MAIORKA et al., 2000).

A integridade física das células e a camada protetora de muco funcionam como uma barreira física seletiva de proteção do interior do organismo. No entanto, estes mecanismos não possuem suficiente eficácia para impedirem a penetração de microrganismos por si sós. Assim, a mucosa intestinal possui "reforço" no mecanismo alternativo de defesa junto ao sistema imunológico, conhecido como tecido linfóide associado ao intestino (GALT). A presença e a funcionalidade do GALT são muito

importantes para a saúde do animal, pois todo trato intestinal está continuamente exposto a antígenos do alimento, aos microrganismos mutualísticos e patógenos entéricos (BAO; CHOCT, 2010).

Na verdade, o epitélio da mucosa não é apenas uma barreira física, mas também um iniciador de resposta imune inata contra patógenos. Células epiteliais especializadas podem produzir enzimas bactericidas. Berndt et al. (2007) dizem que o encontro de células epiteliais com bactérias estimula a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias, atraindo as células imunitárias inatas, tais como heterófilos, macrófagos e células dendríticas imaturas, as quais são responsáveis por constituírem a primeira linha de defesa da ave, pois fagocitam e matam agentes patogênicos desencadeando novas formas de respostas imunes.

Todo esse mecanismo de proteção do epitélio e defesa conferida pelo sistema imune das aves é de extrema importância porque o intestino é um importante local de desenvolvimento, residência e porta de entrada para microrganismos patogênicos nos tecidos mais profundos do corpo, sendo assim, qualquer perturbação da fisiologia do intestino muitas vezes resulta em consequências clínicas significativas. Portanto, uma capacidade imunológica eficaz no intestino é essencial para combater uma variedade de microrganismos patogênicos que podem se alojar neste tecido (SMITH; BEAL, 2008).

2.3 *Salmonella* Enteritidis

A *Salmonella* spp. é uma bactéria responsável pela maioria das intoxicações de origem alimentar em humanos, sendo a *Salmonella* Enteritidis uma das espécies de maior ocorrência. Segundo Spolaore et al. (2007), esses tipos de bactérias pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, que se dividem em duas espécies: a *Salmonella enterica*, que contém mais de 2.519 sorovares, e a *Salmonella bongori*, com 22 sorovares, sendo que a espécie *enterica* subdivide-se em seis subespécies e infectam uma grande número de animais.

Estudos epidemiológicos demonstram que a *Salmonella* spp. é responsável pela maioria das intoxicações de origem alimentar em humanos, sendo que *Salmonella* Enteritidis está entre os sorovares de maior ocorrência devido ao consumo de carne de aves e ovos contaminados, assim como de seus derivados (SILVA; DUARTE, 2002). A epidemiologia da *Salmonella* em aves é complexa porque ocorre duas formas de transmissão, a transmissão vertical e a horizontal. A transmissão vertical ocorre através

da contaminação do tecido reprodutivo na matriz e, durante formação do folículo da gema ou do albúmen, os ovos férteis são contaminados com a bactéria (COX et al., 2000). Já a transmissão horizontal ocorre por disseminação dos microrganismos no ambiente e a nas rações, passando a doença entre as aves no mesmo ambiente (STERZO et al., 2008).

Ao infectar as aves, a *Salmonella* invade o organismo através da mucosa intestinal da ave, provocando rupturas e o afastamento das microvilosidades, migrando através das células para a corrente sanguínea, tecido linfático, fígado, baço, medula óssea, e epitélio intestinal, causando lesões severas no organismo do animal (CHADFIELD et al., 2003).

A capacidade do patógeno de invadir diferentes tipos de células no organismo compromete a capacidade produtiva dos animais e inviabiliza a comercialização de carcaça e demais produtos de origem animal. A capacidade de *Salmonella* spp. invadir células do intestino e sobreviver no interior de macrófagos deve-se a regiões do genoma cromossomo denominadas ilhas de patogenicidade (SPI – “*Salmonella* Patogenicity Islands”) (MORGAN, 2008; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A SPI-1 contém genes responsáveis por codificar o sistema de secreção tipo três (SSTT), com finalidade de injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma celular, reorganizando o citoesqueleto e permitindo que o microrganismo invada o epitélio intestinal. A SPI-2 contém genes que codificam outro tipo de SSTT, necessário para a sobrevivência de *Salmonella* spp. no interior dos macrófagos, estabelecendo o trânsito de proteínas bacterianas no ambiente intracelular. Aliado a isso, SPI-2 atua na inativação da enzima NADPH-oxidase, evitando a morte de SG por “intermediários reativos de oxigênio” (HACKER et al., 1997, HENSEL, 2000).

A avicultura industrial fez, por muito tempo, uso dos antimicrobianos como a principal ferramenta no combate aos patógenos, contribuindo em altos índices na produção. Contudo, o uso indiscriminado de antimicrobianos acarretou no surgimento de estirpes bacterianas resistentes, e por isso, cada vez mais tem se restringido o uso de antimicrobianos no setor (GABRIEL et al., 2006). A União Europeia, como uma das maiores importadores de carne de frango, condicionou os países exportadores a se erradicarem o uso de antimicrobianos na produção avícola, incentivando a busca por alternativas tecnológicas e estratégias de potencialização da resposta de defesa desses animais. Dentre as estratégias adotadas, o aumento da proteção do epitélio intestinal e

da resposta imunológica mostrou-se uma alternativa relevante no controle da *Salmonella*, que podem ser obtidas através da utilização de nutrientes da dieta relacionados com a função intestinal.

2.4 Treonina

A treonina é o terceiro aminoácido limitante em dietas para frangos de corte após a metionina e a lisina, utilizando-se rações a base de milho e farelo de soja (ATENCIO et al., 2004). A treonina está envolvida em importantes funções biológicas como a manutenção, integridade e imunidade do trato gastrintestinal (TGI) e de algumas mucosas e, como consequência, sua exigência pode variar de acordo com a importância de cada função (AZZAM et al., 2011). Estudos demonstraram, por exemplo, que os níveis de treonina digestível para maximizar o ganho de peso e a conversão alimentar de leitões são inferiores àqueles necessários para otimizar a resposta imune (WANG et al., 2006).

A deficiência de treonina pode comprometer a eficiência funcional dos sistemas imunológico e digestivo, devido à importante participação desse aminoácido na síntese de anticorpos e mucina, os quais conferem a proteção e integridade da mucosa. O envolvimento da treonina nos processos fisiológicos da mucosa intestinal é muito extenso, pois aproximadamente 62% da treonina dietética não é recuperada pelo sistema porta, sendo a maior parte dessa parcela (90%) utilizada na síntese de mucina e catabolização por enterócitos para sua manutenção (STOLL et al., 1998; CORZO et al., 2007). As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, sintetizadas pelas células caliciformes, componentes orgânicos principais na composição do muco (95% de água e 5% de mucina) (TON, 2010). O muco, por sua vez, recobre a parede do trato digestório e a protege contra as enzimas digestivas e o dano físico provocado pela digesta (LE BELLEGO; NOBLET, 2002).

O fornecimento limitados de treonina pode prejudicar a síntese de mucina e alterar a integridade da barreira de proteção do epitélio intestinal (LAW et al., 2007), pois em situações de inflamação gastrintestinal, a treonina é bastante retida pelo intestino para manter a sua integridade. Em situação de contaminação patogênica, os processos de defesa e reparação da mucosa aumentam a demanda por aminoácidos, principalmente a treonina (FAURE et al., 2006, 2007).

Segundo Santos et al. (2013), a suplementação de treonina associada a mananoligossacarídeo (MOS) beneficia as características microbiológicas, histológicas e de desempenho em pintos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Além da síntese de mucinas intestinais, outra importante função desempenhada pela treonina para proteção da mucosa intestinal relaciona-se com a síntese de imunoglobulinas A (IgA). Azzam et al. (2011) relataram aumento linear nos níveis de IgA na mucosa do íleo de galinhas poedeiras submetidas a estresse por calor a medida que aumentaram os níveis de treonina na dieta. Segundo Bai et al. (2000), a imunoglobulina A bloquear a adesão dos penetração dos microrganismos nas membranas da mucosa, neutralizando a ação das toxinas bacterianas.

Assim, a utilização de treonina na dieta auxilia na melhoria da resposta de frangos de corte quando submetidos a desafios sanitários pela otimização da síntese de muco e melhora da resposta imunológica dos animais, conferindo à mucosa intestinal maior de proteção contra a ação de patógenos.

2.5 Manipulação térmica durante a incubação

A temperatura é o principal fator físico que determina o sucesso da incubação, pois, a temperatura de incubação pode ter efeito significativo sobre a taxa de eclosão, a qualidade do pintinho, e no desempenho da ave na vida adulta (LOURENS et al., 2007).

Durante a primeira metade do período de incubação, a taxa metabólica embrionária é baixa e a temperatura do ovo é menor que a da incubadora, assim, o embrião ganha apenas o calor do meio. Na segunda metade, a produção de calor metabólico pelo embrião aumenta, a temperatura do ovo fica acima da temperatura da incubadora, fazendo com que o embrião perca calor para o ambiente neste período de incubação (PIAIA, 2005). Certos períodos são críticos durante o desenvolvimento embrionário, e as condições ambientais dentro da incubadora podem predeterminar alterações na fisiologia da ave que permaecem durante a vida pós-eclosão (WASLTRA et al., 2010), o que pode resultar em adaptações epigenéticas (TZSCHENTKE, 2007).

Tem-se observado que as manipulações térmicas durante a incubação podem ser uma forma de melhorar a resposta de animais à estresse patogênico ou não. Estudos desenvolvidos por Yahav et al. (2004) observaram maior resistência ao desafio térmico e reduções nos níveis de corticosterona em pintinhos de três dias de idade previamente tratados por calor entre décimo sexto dia de desenvolvimento embrionário e décimo

oitavo. Contudo, Piestun et al. (2008) observaram que a exposição de embriões ao calor por doze horas no sétimo e no décimo sétimo dia de incubação induziu a eclosão precoce e reduziu as concentrações plasmáticas de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) e corticosterona aos 35 dias quando submetidos a estresse térmico de 35°C. No estudo desenvolvido por Walstra et al. (2010), foi observado que o aumento na temperatura de incubação proporcionou redução no tempo de incubação e da temperatura cloacal dos pintinhos, não sendo observados efeitos sobre o peso do pintinho na eclosão e eclodibilidade.

A exposição de embriões a temperatura reduzida durante a incubação também vem sendo estudada na aquisição de termotolerância. Segundo Mortola (2006), a baixa temperatura na incubação reduziu a termogênese corporal durante a incubação e na vida pós-eclosão, diminuindo a eclodibilidade e o peso dos pintinhos, com consequente redução na taxa de crescimento dos frangos de corte.

Tem sido sugerido que aquisição de termotolerância está relacionada com a síntese de grupo de proteína chamadas proteínas do choque térmico (HSPs). Quando a temperatura excede o limite de estabilidade térmica intrínseca das proteínas, estas sofrem disfunção por desnaturação. Durante a incubação, disfunção de uma ou mais proteínas podem causar malformações ou morte embrionária. Para que isso não ocorra, a resposta celular aos fatores de estresse envolve a ativação ou inibição dos genes de proteínas de choque térmico, cujos níveis de atividade podem ser utilizados como indicadores de altos ou baixos níveis de estresse (MACARI et al., 2013).

A resposta ao estresse é uma resposta inespecífica e, portanto, situações que induzam a termotolerância poderiam aumentar, além da resistência ao estresse térmico, a resistência a outros tipos de estresse. Nesse sentido, segundo Norup et al. (2008), a exposição a situações de estresse não infecciosas pode preparar o sistema imune para combater desafios infecciosos. Portanto, a manipulação térmica durante a incubação se torna importante para estudar formas de amenizar os efeitos deletérios causados por patógenos, e assim contribuindo na maximização do potencial produtivo de aves Label Rouge.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal e Microbiologia pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) na cidade de Areia - PB. O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba sobre o protocolo de número CEUA 0311/13.

3.1 Parâmetros de Incubação

Foram utilizados 180 ovos com peso médio de $65,06 \pm 3,6g$ provenientes de matrizes da linhagem caipira Label Rouge com 52 semanas (FerrazAvícola, São Bento do Una-PE). Assim que chegaram, os ovos ficaram em repouso em uma sala com temperatura ambiente durante 12 horas e em seguida foram distribuídos em três incubadoras artificiais desinfetadas (IP130, incubadoras Premium Ecológica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) com controle de temperatura e virador automático. Do primeiro ao décimo primeiro dia (DE11), todos os ovos foram mantidos em condições normais de incubação com temperatura de $37,7^{\circ}C$ e umidade relativa de 60% com viragem a cada duas horas. No décimo primeiro dia de incubação (DE11) procedeu-se à ovoscopia com o objetivo de descartar os embriões mortos e ovos claros. A partir do 11º dia os ovos foram divididos em três tratamentos: temperatura ideal de incubação ($37,7^{\circ}C$), alta temperatura de incubação ($38,7^{\circ}C$) e baixa temperatura de incubação ($36,7^{\circ}C$). Foi utilizado lote misto de pintinhos (GIVISIEZ et al., 2003).

As variáveis avaliadas foram o peso do pinto à eclosão, o percentual de eclodibilidade fértil levando-se em consideração total de ovos férteis, mortalidade embrionária através da quebra dos ovos não eclodidos para definir a idade aproximada da morte embrionária (MACARI et al., 2013) e o início da eclosão determinado a partir do início da eclosão do primeiro ovo.

3.2 Eclosão e instalações

À eclosão, os pintinhos foram pesados individualmente e o estado negativo de *Salmonella* spp. foi confirmado através de “swab” cloacal realizado em dez animais por temperatura de incubação. Em seguida, os animais foram distribuídos em um

delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3x2+1, com três temperaturas de incubação (baixa, ideal e alta), dois níveis de treonina na dieta (nível basal e nível elevado) e um grupo testemunha (sem *Salmonella*, nível basal de treonina e temperatura ideal de incubação), totalizando seis tratamentos com 10 repetições, considerando cada ave uma repetição.

Os animais foram alojados em caixas de madeira com tampas de nylon para evitar contaminação do ambiente, as caixas foram equipadas com bebedouro e comedouro. A temperatura e umidade da sala foram controladas com o uso de três termohigrômetros digitais posicionados próximos as caixas de alojamento dos pintinhos (Oregon Scientific, Portland, EUA).

3.3 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram compostas principalmente por farelo de soja e milho para as fases pré-inicial e inicial seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011) exceto pelo nível elevado de treonina utilizado em uma das dietas. O valor de treonina elevada para as fases pré-inicial e inicial foi de aproximadamente 11,5% acima das recomendações de Rostagno et al. (2011).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

(continua)

| Ingredientes | Nível de treonina | | | |
|------------------------|----------------------------------|---------|-------------------------------|---------|
| | Fase pré-inicial (1 a 7 dias) | | Fase inicial (7 a 14 dias) | |
| | Basal | Elevado | Basal | Elevado |
| Milho Grão | 57,56 | 57,56 | 58,00 | 58,00 |
| Farelo de Soja 45 % | 27,30 | 27,30 | 25,00 | 25,00 |
| Glúten de milho 60% | 6,50 | 6,50 | 6,35 | 6,20 |
| Óleo de Soja | 3,50 | 3,50 | 4,10 | 4,10 |
| Fosfato de bicálcico | 1,95 | 1,95 | 1,55 | 1,55 |
| Calcário | 0,85 | 0,85 | 0,88 | 0,87 |
| L-Lisina HCl | 0,57 | 0,57 | 0,48 | 0,47 |
| DL-Metionina | 0,30 | 0,30 | 0,24 | 0,23 |
| L-Treonina | 0,15 | 0,27 | 0,10 | 0,20 |
| Inerte | 0,78 | 0,66 | 1,31 | 1,41 |
| Sal Comum | 0,40 | 0,40 | 0,33 | 0,38 |
| Cloreto de Colina | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 |
| Minerais ¹ | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Vitaminas ² | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

¹Premix mineral (concentração/kg do produto): Mn – 60g; Fe – 80g; Zn – 50g; Cu – 10g; Co – 2g; I – 1g; veículo q.s.p. – 1000g. ²Premix vitamínico (concentração/kg do produto): vit. A – 15.000.000 UI; vit. D3 – 1.500.000 UI; vit. E – 15.000 UI; vit. B1 – 2,0g; vit. B2 – 4,0g; vit. B6 – 3,0g; vit. B12 – 0,015g; Ácido nicotínico – 25g; Ácido pantotênico – 10g; vit. K3 – 3,0g; Ácido fólico – 1,0g; Antioxidante BHT – 10g; veículo q.s.p. – 1.000g.

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

| Composição calculada | | | | (conclusão) |
|---------------------------------|--------|--------|--------|-------------|
| Energia Metabolizável (kcal/kg) | 2.950 | 2.943 | 3.002 | 3.001 |
| Proteína Bruta (%) | 22,16 | 22,17 | 20,80 | 20,79 |
| Cálcio (%) | 0,9210 | 0,9176 | 0,8219 | 0,8182 |
| Fósforo Disponível (%) | 0,4708 | 0,4691 | 0,3905 | 0,3903 |
| Metionina + Cisteinadig(%) | 0,9398 | 0,9363 | 0,8490 | 0,8409 |
| Lisina dig(%) | 1,3120 | 1,3072 | 1,1779 | 1,1691 |
| Treonina (%) | 0,857 | 0,956 | 0,764 | 0,852 |
| Sódio (%) | 0,1964 | 0,1957 | 0,1663 | 0,1861 |
| Cloro (%) | 0,2745 | 0,2735 | 0,2315 | 0,2612 |
| Potássio (%) | 0,6886 | 0,6881 | 0,6442 | 0,6442 |

¹Premix mineral (concentração/kg do produto): Mn – 60g; Fe – 80g; Zn – 50g; Cu – 10g; Co – 2g; I – 1g; veículo q.s.p. – 1000g. ²Premix vitamínico (concentração/kg do produto): vit. A – 15.000.000 UI; vit. D3 – 1.500.000 UI; vit. E – 15.000 UI; vit. B1 – 2,0g; vit. B2 – 4,0g; vit. B6 – 3,0g; vit. B12 – 0,015g; Ácido nicotínico – 25g; Ácido pantotênico – 10g; vit. K3 – 3,0g; Ácido fólico – 1,0g; Antioxidante BHT – 10g; veículo q.s.p. – 1.000g.

3.4 Preparo do inóculo e inoculação

O desafio por *Salmonella* Enteritidis^{Nal⁺} foi realizado aos 2 dias de idade. Para o preparo do inóculo, foi realizado o cultivo a partir de uma estirpe bacteriana induzindo o gene de resistência ao ácido nalidíxico (*Salmonella* Enteritidis^{Nal[®]}) em caldo nutriente (Acumedia, EUA) em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C, o que indica desenvolvimento satisfatório da bactéria. Em seguida foi retirada alíquota de 0,1 mL da cultura e cultivado novamente em um novo caldo nutriente a 37°C por quatro horas, em incubadora com agitação orbital de 78 rotações/minuto. Para determinação da concentração do inóculo foi realizado o plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante (Acumedia, EUA) contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL), com posterior incubação a 37°C e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Salmonella* Enteritidis^{Nal[®]}. Para determinar o tempo de concentração necessária de UFC/ml foi realizada uma curva de crescimento. Todos os pintinhos de cada caixa foram inoculados no papo utilizando-se 0,5mL de cultura de *Salmonella* (1,9 x 10⁷ UFC/mL) exceto os animais do tratamento testemunha.

3.5 Análise de desempenho

Para avaliação do desempenho os animais foram pesados no início e ao final do período experimental, obtendo-se assim, os valores de peso inicial (PI) e peso final (PF), através desde dados procedeu-se o cálculo do ganho de peso (GP). Por falta de

espaço todos os animais se alimentaram em um mesmo comedouro, portanto não foi coletado os dados do consumo de cada animal e a conversão alimentar.

3.6 Análise microbiológica

Aos 10 dias de idade ou oito dias pós-inoculação (8dpi) todos os animais foram pesados e abatidos por deslocamento cervical. Para realização das análises microbiológicas procedeu-se a colheita do conteúdo cecal de todos os animais por tratamento (n=10). O conteúdo cecal foi pesado e em seguida realizou-se a diluição em série com solução de água peptonada (Acumedia, EUA) em microtubos de 1,5mL. Alíquotas de 20µl foram cultivadas em ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL), em seguida as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, procedeu-se então a contagem das colônias e os valores foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de conteúdo cecal (UFC/g).

3.7 Análise morfométrica do intestino delgado

Para as análises histológicas realizou-se a colheita de amostras de aproximadamente 3 cm da porção medial do duodeno, jejuno e íleo de quatro animais por tratamento. As amostras foram lavadas com soro fisiológico NaCl 0,9% e fixadas em formol a 10% por 24 horas. Em seguida, foram desidratadas em série crescentes de álcoois (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foi realizada a microtomia semi-seriada a uma espessura de 5 µm, sendo 5 a 7 cortes colocados em cada lâmina, para cada animal foram confeccionadas duas lâminas por segmento intestinal. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscopia de luz. O estudo morfométrico foi realizado utilizando-se o sistema analisador de imagens Image J (ABRAMOFF et al., 2004).

As variáveis estudadas foram altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilosidade:cripta. A altura de vilosidade foi determinada a partir da sua região basal que coincide com a superfície da cripta até seu ápice, e a profundidade de cripta foi medida a partir da região de transição vilosidade-cripta até sua base. Para cada animal foram realizadas 20 mensurações totalizando 80 mensurações por tratamento, para cada variável estudada. A partir dos resultados obtidos para altura de vilosidades e profundidade de cripta, procedeu-se o cálculo da relação vilosidade:cripta.

3.8 Análise sanguínea

A colheita do sangue foi realizada pelo método de punção cardíaca, sendo colhidas cinco amostras de sangue por tratamento no dia do abate (8dpi). Imediatamente após a colheita foram confeccionadas as extensões sanguíneas de sangue circulante sem anticoagulante (esfregaço). Em seguida, as lâminas foram coradas utilizando-se a coloração de May-Grunwald-Giemsa-Wright.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por microscopia óptica, em objetiva de imersão (aumento de 1000x) e os resultados foram expressos em porcentagem. Na contagem são diferenciados os heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em forma de “torre” a cada 3 ou 4 campos, próximo a borda do esfregaço, contando 100 células em uma borda e 100 células na outra borda, totalizando a contagem de 200 células. O valor relativo das células foi obtido calculando-se a média das duas contagens.

3.9 Análise estatística

Os dados referentes aos parâmetros de incubação foram analisados através do aplicativo Microsoft Excel, empregando-se estatística descritiva simples. O teste de Dunnet a 5% de probabilidade foi utilizado para comparar os dados de desempenho, morfometria e parâmetros sanguíneos dos tratamentos infectados com *Salmonella* (temperaturas de incubação e níveis de treonina) em relação ao grupo testemunha, o qual consistiu de animais incubados em temperatura ideal, alimentados com nível basal de treonina e não infectados. Os dados de desempenho, de contagem bacteriana, de morfometria e hematologia foram analisados seguindo delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2+1 (três temperaturas de incubação x dois níveis de treonina na dieta e um grupo testemunha). Para desempenho (peso inicial, peso final e ganho de peso) e contagem bacteriana, utilizou-se dez repetições, considerando cada ave uma repetição. No estudo morfométrico, foram realizadas 20 leituras por animal (4) por tratamento, totalizando 80 repetições por tratamento e para cada variável estudada. Para hematologia foram utilizadas 5 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância no programa estatístico Assistat versão 7.6 beta (UFMG, 2012). Médias diferentes foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de incubação de ovos férteis da linhagem Label Rouge incubados em temperaturas baixa (36,7°C), ideal (37,7°C) e alta (38,7°C) estão apresentados na Tabela 2. O número de pintinhos nascidos foi maior na incubadora com alta temperatura e menor na baixa temperatura. As eclodibilidades total e fértil foram maiores para ovos incubados em alta temperatura e menor para aqueles incubados em baixa temperatura. Collin et al. (2007) relatam que a redução da temperatura cloacal e eclosão precoce quando os ovos foram aclimatados a 39,5°C durante três horas entre o oitavo e décimo dia de incubação ou do décimo sexto ao décimo oitavo dia.

Houve mortalidade apenas na terceira semana de incubação e esta foi maior para ovos incubados em baixa temperatura quando comparados às demais temperaturas de incubação. A incubação foi mais curta para ovos incubados em alta temperatura e mais longa para ovos incubados em baixa temperatura. A manipulação da temperatura de incubação não interferiu negativamente sobre o peso dos pintinhos, pois não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 2. Parâmetros de incubação de ovos férteis da linhagem Label Rouge incubados em diferentes temperaturas.

| Parâmetros de incubação | Temperatura de incubação | | |
|---------------------------|--------------------------|----------------|---------------|
| | Baixa (36,7°C) | Ideal (37,7°C) | Alta (38,7°C) |
| Ovos incubados (n) | 60 | 59 | 60 |
| Ovos claros (n) | 3 (1) | 1 | 3 |
| Ovos férteis | 57 | 58 | 57 |
| Pintinhos nascidos (n) | 47 | 51 | 54 |
| Eclodibilidade total (%) | 78,3 | 86,4 | 90,0 |
| Eclodibilidade fértil (%) | 82,5 | 87,9 | 94,7 |
| Mortalidade total (%) | 18,3 | 10,0 | 6,7 |
| Início da eclosão (h) | 479 | 473,3 | 471 |
| Peso do pintinho (g) | 47,5 ± 2,77 a | 48,2 ± 3,09 a | 48,1 ± 2,81 a |

h=horas; g=gramas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3, dados serão primeiramente discutidos em relação ao grupo testemunha (teste de Dunnet) e depois entre os tratamentos de incubação e níveis de treonina (teste de Tukey).

O peso inicial das aves do tratamento testemunha foi semelhante ($P>0,05$) ao peso dos pintinhos incubados em diferentes temperaturas de incubação ou alimentados com diferentes níveis de treonina. Aves incubadas a baixa temperatura ou alimentadas com nível basal de treonina apresentaram peso final e ganho de peso menores ($P<0,05$)

em relação ao grupo testemunha, evidenciando o efeito prejudicial da infecção por *Salmonella* nesses animais. Porém, não houve diferença para animais incubados em alta temperatura, temperatura ideal ou treonina elevada. Esses dados corroboram estudos anteriores em que frangos de corte Cobb500 incubados em baixa temperatura ou alimentados com nível basal de treonina e desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos 2 dias de idade apresentaram menor peso final e ganho de peso que o grupo testemunha (MOREIRA FILHO et al., 2015).

Para peso inicial não houve interação ($P>0,05$) entre temperatura de incubação e níveis de treonina, portanto, os dados foram analisados pelo teste de Tukey apenas para os fatores principais (temperatura e nível de treonina) e estão apresentados na Tabela 3. Para peso final e ganho de peso, houve interação entre os fatores principais, portanto, apenas os dados desdobrados serão discutidos (Tabela 4, teste de Tukey).

O peso inicial de pintinhos incubados em alta temperatura foi maior ($P<0,05$) do que o de pintinhos incubados em baixa temperatura, e esses tratamentos não foram diferentes ($P>0,05$) da temperatura ideal. O peso inicial de animais alimentados com nível de treonina basal foi semelhante ($P>0,05$) ao peso inicial de animais alimentadas com treonina elevada (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho produtivo de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos dois dias de idade. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão ($n=20$ para temperaturas de incubação e $n=30$ para níveis de treonina).

| Temperatura de incubação | Peso inicial (g) | Peso final (g) | Ganho de peso (g) |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Baixa | 47,40 \pm 2,1 bA | 181,54 \pm 17,3 B | 134,13 \pm 16,8 B |
| Ideal | 48,04 \pm 2,1 abA | 194,50 \pm 12,6 A | 146,45 \pm 14,0 A |
| Alta | 49,59 \pm 2,0 aA | 194,32 \pm 20,1 A | 144,77 \pm 19,7 A |
| Testemunha | 47,81 \pm 2,2 A | 197,18 \pm 9,2 A | 149,36 \pm 10,6 A |
| Níveis de Treonina | | | |
| Basal | 48,01 \pm 2,0 aA | 181,70 \pm 13,4 B | 133,68 \pm 13,7 B |
| Elevada | 48,66 \pm 2,2 aA | 198,54 \pm 18,2 A | 149,88 \pm 17,9 A |
| Testemunha | 47,81 \pm 2,2 A | 197,18 \pm 9,2 A | 149,36 \pm 10,6 A |
| Temperatura (A) | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| Treonina (B) | NS | <0,01 | <0,01 |
| Interação (A x B) | NS | <0,01 | <0,01 |

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem do tratamento testemunha a 5% de probabilidade pelo teste Dunnet.

NS - Não significativo.

Animais incubados em temperatura baixa ou alta apresentaram peso final e ganho de peso maiores ($P<0,05$) quando alimentadas com nível elevado de treonina. Para animais incubados em temperatura ideal não houve diferença estatística no peso final entre os animais alimentados com diferentes níveis de treonina, no entanto, o ganho de peso foi maior ($P<0,05$) em animais alimentados com dieta basal.

Animais alimentados com dieta basal apresentaram maior ($P<0,05$) peso final e ganho de peso no tratamento temperatura ideal de incubação. No entanto, animais alimentados com nível elevado de treonina apresentaram maior ($P<0,05$) peso final e ganho de peso no tratamento de alta temperatura de incubação.

O dados de Moreira Filho et al. (2015) não corroboram com o presente estudo, pois não houve interação entre os fatores temperatura de incubação e níveis de treonina, como também não foi observado efeito destes fatores. Por outro lado, quando os tratamentos de temperatura de incubação foram comparados à testemunha, foi observado que animais tratados com frio apresentaram menor ($P<0,05$) peso final e ganho de peso quando comparados à testemunha. O mesmo efeito não foi observado para os tratamentos de temperatura ideal e calor, os quais apresentaram desempenho semelhante.

Tabela 4. Desdobramento das interações de peso final (g) e ganho de peso (g) de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos dois dias de idade. Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão (n=20 para temperaturas de incubação e n=30 para níveis de treonina).

| Níveis de treonina | | Temperatura de incubação | | |
|--------------------|---------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| | | Baixa | Ideal | Alta |
| Peso final (g) | Basal | 173,3 ± 15,3 bB | 197,5 ± 9,2 aA | 174,3 ± 4,3 bB |
| | Elevada | 189,8 ± 20,0 aB | 191,4 ± 14,3 aB | 214,4 ± 11,7 aA |
| Ganho de peso (g) | Basal | 125,01± 15,4 bB | 150,2 ± 9,4 aA | 126,4 ± 4,1 bB |
| | Elevada | 142,3 ± 18,9 aB | 142,7 ± 16,5 bB | 164,5 ± 10,6 aA |

Médias seguidas de mesmas letras, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5, os tratamentos de temperatura de incubação, não houve diferença ($P>0,05$) entre o número de animais infectados. O tratamento de nível basal de treonina apresentou maior número de animais infectados quando comparado a dieta de nível elevado ($P=0,0127$, Teste Exato de Fisher). Não houve interação entre temperatura de incubação e níveis de treonina para a contagem bacteriana no conteúdo cecal, logo, os dados foram analisados apenas para os fatores principais (temperatura e nível de treonina).

A alta temperatura de incubação reduziu significativamente ($P<0,05$) a contagem bacteriana quando comparada às demais temperaturas. Isso pode ter ocorrido porque essas aves passaram por estresse por calor durante a fase embrionária resultando em mudanças no metabolismo durante a incubação, podendo potencializar o sistema imune. Segundo Waslra et al. (2010), as condições ambientais dentro da incubadora podem predeterminar alterações na fisiologia do animal que persistem durante toda a vida após o nascimento.

O tratamento de nível elevado de treonina apresentou menor ($P<0,05$) contagem bacteriana no conteúdo cecal com relação ao nível basal. Isso pode indicar que frangos caipira possuam maior resistência a desafios patogênicos que frangos Cobb500. Contudo, a temperatura de calor ($38,7^{\circ}\text{C}$) durante a incubação reduziu ($P<0,05$) a contagem de *Salmonella* Enteritidis, concordando com o atual trabalho. Os dados de Santos (2009) também evidenciaram maior resistência de aves Label Rouge ao desafio por *Salmonella* Enteritidis do que aves de genótipo para crescimento rápido. A maior resistência de aves caipira ao desafio por *Salmonella* pode ter sido devido à rusticidade genotípica que é característica dessas espécies. Para confirmar essa suposição, novos estudos estão sendo realizados para avaliar a diferença entre os genótipos de forma mais aprofundada, incluindo expressão gênica intestinal e microbioma intestinal.

Tabela 5. Contagem bacteriana do conteúdo cecal (Log_{10} UFC/g) de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos dois dias de idade.

| Temperatura de incubação | Infectados/Total de aves ¹ | UFC ² (Log_{10}) |
|--------------------------|---------------------------------------|--|
| Baixa | 14/20 A (70%) | $4,4 \pm 2,4$ a |
| Ideal | 16/20 A (80%) | $4,9 \pm 1,9$ a |
| Alta | 10/20 A (50%) | $2,6 \pm 1,6$ b |
| Níveis de Treonina | | |
| Basal | 25/30 A (83%) | $4,6 \pm 1,7$ a |
| Elevada | 15/30 B (50%) | $3,1 \pm 2,9$ b |
| Temperatura (A) | | $<0,05$ |
| Treonina (B) | | $<0,05$ |
| Interação (A x B) | | NS |

¹Letras maiúsculas indicam diferença pelo teste exato de Fisher ($P=0,0958$ entre Alta e Ideal; $P=0,332$ entre Alta e Baixa; $P=0,7164$ entre Ideal e Baixa; $P=0,0127$ entre Treonina Basal e Elevada).

²Valores médios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de conteúdo cecal transformados em Log_{10} . Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

NS - Não significativo.

No segmento duodenal (Tabela 6), animais do tratamento de temperatura alta de incubação ou do tratamento alimentado com alto nível de treonina tiveram altura de vilosidade (AV), profundidade de cripta (PC) e relação vilo:cripta (V:C) semelhantes

($P>0,05$) ao grupo testemunha. Animais submetidos a baixa temperatura de incubação ou baixo nível de treonina tiveram menor AV, maior PC e menor V:C e com relação ao tratamento testemunha ($P<0,05$). Finalmente, o tratamento de temperatura ideal resultou em menores AV, PC e V:C ($P<0,05$) quando comparado ao tratamento testemunha.

No jejuno, os três tratamentos de temperatura de incubação e nível basal de treonina apresentaram menor ($P<0,05$) AV com relação ao grupo testemunha, contudo, animais do tratamento de nível elevado apresentaram altura semelhante ($P>0,05$). Tratamento de alta temperatura de incubação ou tratamento com nível elevado de treonina tiveram PC semelhante ($P>0,05$) ao grupo testemunha. A relação V:C de todos os tratamentos foi inferior ($P<0,05$) ao tratamento testemunha.

No segmento ileal, todos os tratamentos de temperatura de incubação e níveis de treonina apresentaram menor ($P<0,05$) AV com relação ao grupo testemunha, exceto o tratamento de alta temperatura de incubação, que apresentou altura semelhante ($P>0,05$). Na PC observa-se que não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos da dieta e o grupo testemunha, contudo, os tratamentos de temperatura baixa e ideal apresentaram resultados melhores ($P<0,05$) com relação ao grupo testemunha. A relação V:C dos tratamentos nível elevado de treonina, temperatura ideal e alta foi semelhante ($P>0,05$) ao grupo testemunha. Em conjunto, os dados mostram que o nível elevado de treonina na dieta ou a temperatura alta de incubação foram capazes de preservar os parâmetros de morfologia intestinal mesmo na presença de *Salmonella* Enteritidis, mas não o nível basal de treonina ou a temperatura baixa de incubação. Pois, segundo Strober et al. (2002), a inflamação no intestino causa o aumento da perda de enterócitos no ápice da vilosidade assim como a hiperplasia da cripta, tendo como consequência a diminuição da altura de vilosidade e aumento da profundidade de cripta. Observa-se que os tratamentos treonina elevada e alta temperatura de incubação apresentaram mais resultados semelhantes ao grupo testemunha em relação aos demais tratamentos. Isso mostra que estes tratamentos amenizam significativamente os efeitos negativos da *Salmonella*. Quando a ave é submetida a um desafio térmico durante a fase embrionária, pode ocorrer mudanças fisiológicas permanentes na fase pós eclosão (TZSCHENTKE, 2007) que, por sua vez, pode modificar de forma benéfica o metabolismo e o sistema imune, tornando a ave mais resistente à diversos desafios.

Quando foi realizada a análise de variância, não houve interação ($P>0,05$) entre temperatura de incubação e níveis de treonina para altura de vilosidade do duodeno,

deste modo, os dados foram analisados apenas para os fatores principais (temperatura e nível de treonina). No entanto, houve interação entre os fatores principais para profundidade de cripta e relação vilo:cripta do duodeno, assim como nos segmentos jejuno e íleo, que apresentaram interação ($P<0,05$) para todas as análises morfométricas (AV, PC e V:C), portanto, esses foram desdobrados e os dados estão apresentados na Tabela 7.

A altura de vilosidade duodenal foi maior ($P<0,05$) em animais incubados a alta temperatura de incubação ou animais alimentados com nível elevado de treonina, quando comparados aos demais tratamentos de incubação e os animais alimentados com baixo nível de treonina, respectivamente.

Esses dados confirmam o efeito benéfico desses dois tratamentos, mas não dos demais tratamentos de incubação, em face ao desafio com *Salmonella*. A treonina elevada pode ter resultado em maior proteção da mucosa intestinal, já que os níveis de suplementação de treonina para otimizar o sistema imune em leitões são maiores que os níveis necessários para otimizar o desempenho produtivo (WANG et al., 2006). Em estudos anteriores, Moreira Filho (2014) observou que animais tratados com calor apresentaram melhores resultados ($P<0,05$) para altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta, contudo, o tratamento testemunha apresentou maior relação V:C quando comparado aos demais tratamentos de temperatura e níveis de treonina. Isso pode mostrar que aves da linhagem Cobb500 são mais sensíveis aos efeitos deletérios da *Salmonella* que aves Label Rouge. Santos et al (2013) confirmam que nível elevado de treonina aumenta a altura de vilosidade e relação V:C de aves desafiadas com *Salmonella*.

Tabela 6. Efeito da manipulação térmica embrionária e níveis de treonina sobre a morfometria [altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta (VC)] do intestino delgado de frangos Label Rouge. As aves foram desafiadas ou não com *Salmonella* Enteritidis (8dpi).

(continua)

| Temperatura de Incubação | Duodeno (μm) | | |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|-------------|
| | Altura de vilosidade | Profundidade de cripta | Relação V:C |
| Baixa | 1286,5 bB | 50,2 A | 26,4 B |
| Ideal | 1241,1 bB | 45,2 B | 29,1 B |
| Alta | 1383,9 aA | 44,2 B | 32,6 A |
| Testemunha | 1431,3 A | 40,8 B | 35,4 A |

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem do tratamento testemunha a 5% de probabilidade pelo teste Dunnet.

NS - Não significativo.

Tabela 6. Efeito da manipulação térmica embrionária e níveis de treonina sobre a morfometria [altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta (VC)] do intestino delgado de frangos Label Rouge. As aves foram desafiadas ou não com *Salmonella* Enteritidis (8dpi).

| (conclusão) | | | |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|---------------|
| Níveis de Treonina | | | |
| Basal | 1242,8 bB | 54,6 A | 23,3 B |
| Elevada | 1364,9 aA | 38,4 B | 35,5 A |
| Testemunha | 1431,3 A | 40,8 B | 35,4 A |
| Temperatura (A) | <0,05 | <0,01 | <0,01 |
| Treonina (B) | <0,05 | <0,01 | <0,01 |
| Interação (A x B) | NS | <0,01 | <0,05 |
| Jejuno (µm) | | | |
| Temperatura de Incubação | Altura de vilosidade | Profundidade de cripta | Relação (V:C) |
| Baixa | 641,12 B | 65,62 A | 10,07 B |
| Ideal | 659,73 B | 67,84 A | 9,82 B |
| Alta | 605,22 B | 64,29 B | 9,54 B |
| Testemunha | 672,73 A | 63,56 B | 10,67 A |
| Níveis de Treonina | | | |
| Basal | 598,62 B | 69,30 A | 9,78 B |
| Elevada | 672,02 A | 62,53 B | 9,86 B |
| Testemunha | 672,73 A | 63,56 B | 10,67 A |
| Temperatura (A) | 0,01 | 0,01 | 0,05 |
| Treonina (B) | 0,01 | 0,01 | NS |
| Interação (A x B) | 0,01 | 0,05 | 0,01 |
| Íleo (µm) | | | |
| Temperatura de Incubação | Altura de vilosidade | Profundidade de cripta | Relação (V:C) |
| Baixa | 411,16 B | 67,67 C | 6,17 B |
| Ideal | 425,63 B | 66,19 C | 6,41 A |
| Alta | 494,72 A | 78,28 A | 6,36 A |
| Testemunha | 495,53A | 71,55 B | 6,57 A |
| Níveis de Treonina | | | |
| Basal | 440,36 B | 72,28 A | 6,21 B |
| Elevada | 437,31 B | 69,14 A | 6,42 A |
| Testemunha | 495,53A | 71,55 A | 6,57 A |
| Temperatura (A) | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Treonina (B) | NS | 0,01 | 0,01 |
| Interação (A x B) | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem do tratamento testemunha a 5% de probabilidade pelo teste Dunnet.

NS - Não significativo.

Em todas as temperaturas de incubação, foi encontrado menor ($P<0,05$) profundidade de cripta e maior ($P<0,05$) relação vilo:cripta no duodeno de animais alimentados com nível elevado de treonina. Animais alimentados com nível basal de treonina tiveram maior ($P<0,05$) profundidade de cripta em aves submetidas a baixa e alta temperatura de incubação, e a relação vilo:cripta não teve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos de temperatura de incubação. Animais alimentados com nível elevado de treonina apresentaram menor profundidade de cripta e maior relação

vilo:cripta em animais submetidos a alta temperatura de incubação ($P<0,05$), enquanto animais incubados em baixa temperatura apresentaram maior PC e menor V:C que os demais tratamentos ($P<0,05$). A PC diminuiu e a relação V:C foi maior com o aumento na temperatura de incubação de baixa para ideal e depois para alta ($P<0,05$).

No jejuno, as temperaturas de incubação ideal e alta apresentaram maior ($P<0,05$) AV em animais alimentados com nível elevado de treonina, porém, o tratamento de baixa temperatura não apresentou diferença ($P>0,05$) significativa. Para PC, todos os tratamentos de temperatura de incubação apresentaram melhor resultado ($P<0,05$) em animais alimentados com nível basal de treonina. Aves submetidas a baixa temperatura de incubação apresentaram melhor ($P<0,05$) relação V:C quando alimentados com nível basal de treonina, contudo, as mantidas em temperatura ideal não tiveram diferença ($P>0,05$) estatística, e por fim, animais do tratamento de alta temperatura de incubação apresentaram maior ($P<0,05$) relação V:C quando alimentados com nível elevado de treonina. Aves alimentadas com dieta de nível basal de treonina obtiveram melhor ($P<0,05$) resultado de AV em aves submetidas à temperaturas baixa e ideal, porém em nível elevado, as temperaturas ideal e alta apresentaram maior ($P<0,05$) AV. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) na PC nos tratamentos de temperatura de incubação de aves alimentadas com nível basal de treonina, porém, em animais alimentados com nível elevado, observou-se melhor ($P<0,05$) resultado nos tratamentos de baixa e alta temperatura. Em aves alimentadas com nível basal de treonina, a melhor ($P<0,05$) relação V:C foi em aves incubadas em baixa temperatura, bem como em aves alimentadas com nível elevado, foi observado melhor resultado ($P<0,05$) naquelas mantidas em alta temperatura de incubação.

No íleo de aves mantidas em baixa temperatura de incubação obtiveram maior ($P<0,05$) AV quando alimentadas com nível elevado de treonina, porém, as que foram mantidas em temperaturas ideal e alta, foi observado melhor resultado ($P<0,05$) quando alimentadas com nível basal. A baixa temperatura de incubação associada ao tratamento de nível basal apresentou melhor ($P<0,05$) PC, entretanto, nos demais tratamentos de temperatura, o nível elevado de treonina foi melhor ($P<0,05$). O resultado da relação V:C deste segmento foi semelhante ao jejuno, em que aves submetidas a baixa temperatura de incubação apresentaram melhor ($P<0,05$) relação V:C quando alimentadas com nível basal de treonina. As mantidas em temperatura ideal não tiveram diferença ($P>0,05$) estatística, e animais do tratamento alta temperatura de incubação

apresentaram maior ($P<0,05$) relação V:C quando alimentados com nível elevado de treonina.

A AV em aves alimentadas com nível basal foi maior ($P<0,05$) no tratamento alta temperatura de incubação, nas alimentadas com nível elevado, os tratamentos baixa e alta temperatura foram melhores ($P<0,05$). Em aves alimentadas com nível basal, a PC foi melhor ($P<0,05$) em aves submetidas à temperaturas baixa e ideal de incubação, mas em aves alimentadas com elevado nível de treonina, as temperaturas baixa e alta obtiveram PC mais rasa ($P<0,05$). Por fim, aves alimentadas com nível basal apresentaram melhor relação V:C quando mantidas em temperaturas baixa e ideal, e para as alimentadas com nível elevado, a relação V:C foi melhor ($P<0,05$) nos tratamentos de temperaturas ideal e alta. Esses dados demonstram que o tratamento de incubação com alta temperatura, uma vez combinado ao alto nível de treonina na dieta, é capaz de dar suporte à integridade do duodeno na presença de *Salmonella*, o que não é visto no caso da baixa temperatura de incubação.

Anteriormente, no tratamento de treonina elevada, a melhor integridade provavelmente está envolvida na diminuição do número de animais colonizados e também no menor número de colônias de *Salmonella* nos animais positivos (Tabela 5).

O tratamento de alta temperatura de incubação, apesar de não diminuir o número de animais positivos, foi capaz de diminuir a contagem de *Salmonella* nos animais positivos. A treonina está intimamente relacionada com as células caliciformes e a produção de mucinas no intestino, que é a primeira linha de defesa do mesmo frente a desafios sanitários e infecciosos. Segundo Faure et al (2006), o fornecimento limitado de treonina ou situações de estresse prejudicam a síntese de mucinas intestinais, pois quando a treonina é muito utilizada, a sua disponibilidade pode tornar-se limitante para a síntese de mucinas intestinais e, como consequência, ocorrerá comprometimento da barreira de proteção do epitélio intestinal.

De fato, em aves Cobb500, Moreira Filho et al. (2015) relataram maior número de células caliciformes no tratamento elevado de treonina, além de maior expressão do gene *muc2* no duodeno dos animais alimentados com maior nível de treonina e submetidos à temperatura alta de incubação, o que indica maior produção de mucina e, consequentemente, maior proteção da mucosa intestinal.

Finalmente, esses dados são refletidos no desempenho dos animais incubados em temperatura alta e alimentados com nível elevado de treonina, que apresentaram melhor ganho de peso e peso final (Tabela 3).

Os tratamentos de incubação têm efeitos diversos sobre os três segmentos intestinais, de tal forma que há efeito conjunto da treonina dietética. Em aves alimentadas com nível de treonina usado em criações comerciais (basal), a temperatura de incubação não tem efeito sobre a relação V:C no duodeno, porém nos demais segmentos a relação é menor em alta temperatura de incubação. Por outro lado, em aves alimentadas com nível elevado de treonina, a relação V:C é maior nos três segmentos do intestino delgado de aves incubadas em alta temperatura. O segmento ileal também apresentou maior relação V:C em aves do tratamento de temperatura ideal alimentadas com treonina elevada. Esses resultados indicam que os dois fatores atuam conjuntamente para amenizar os efeitos deletérios da *Salmonella* sobre a mucosa do intestino delgado. Zaefarian et al. (2008) verificaram efeito benéfico da suplementação de treonina em diferentes linhagens de frangos de corte sobre a altura de vilosidade, espessura epitelial, número de células caliciformes e profundidade de cripta.

Tabela 7. Desdobramento das interações de altura de vilosidade (exceto duodeno), profundidade de cripta e relação vilo:cripta (V:C) do intestino delgado de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos dois dias de idade.

| Nível de Treonina | Temperatura de incubação | | |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| | Duodeno | | |
| Profundidade cripta | Baixa | Ideal | Alta |
| Basal | 57,43 aA | 51,73 aB | 54,70 abA |
| Elevada | 42,98 bA | 38,62 bB | 33,69 bC |
| Relação V:C | | | |
| Basal | 22,67 bA | 23,25 bA | 23,96 bA |
| Elevada | 30,31 aC | 35,09 aB | 41,34 aA |
| Jejuno | | | |
| Altura de vilosidade | Baixa | Ideal | Alta |
| Basal | 652.74 aA | 622.74 bA | 520.37 bB |
| Elevada | 629.50 aB | 696.72 aA | 690.76 aA |
| Profundidade cripta | | | |
| Basal | 62.30 bA | 62.56 bA | 62.73 bA |
| Elevada | 68.94 aB | 73.11 aA | 65.86 aB |
| Relação (V:C) | | | |
| Basal | 10.80 aA | 10.04 aB | 8.50 bC |
| Elevada | 9.34 bB | 9,60 aB | 10.65 aA |
| Íleo | | | |
| Altura de vilosidade | Baixa | Ideal | Alta |
| Basal | 369.94 bC | 450.80 aB | 500.34 aA |
| Elevada | 452.38 aA | 400.37 bB | 459.09 bA |
| Profundidade cripta | | | |
| Basal | 57.67 bB | 71.54 aB | 87.64 aA |
| Elevada | 77.66 aA | 60.85 bB | 68.93 bA |
| Relação (V:C) | | | |
| Basal | 6.47 aA | 6.40 aA | 5.76 bB |
| Elevada | 5.87 bB | 6.69 aA | 6.69 aA |

Médias seguidas de mesmas letras, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada valor corresponde à média e desvio padrão de 80 observações.

A Tabela 8 apresenta a contagem de heterófilos, linfócitos e relação heterófilo:linfócito (H:L) de frangos Label Rouge submetidos a manipulação da temperatura de incubação, alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão e desafiados com *Salmonella* Enteritidis. O nível de treonina não afetou os parâmetros sanguíneos avaliados, e não houve interação entre os fatores. Portanto, apenas as comparações dos tratamentos com o grupo testemunha e os efeitos da temperatura de incubação serão discutidos.

No fator temperatura de incubação, animais do tratamento baixa temperatura apresentaram maior ($P < 0,05$) número de heterófilos em relação ao tratamento testemunha. Na contagem de linfócitos, o resultado do tratamento de temperatura alta de incubação foi semelhante ($P < 0,05$) ao tratamento testemunha. Todas as temperaturas de incubação tiveram a relação heterófilo:linfócito maior ($P < 0,05$) que tratamento testemunha. A relação heterófilo:linfócito foi considerada um parâmetro confiável para avaliar o nível de estresse em aves por Gross e Siegel em 1983 e vem sendo utilizada desde então em diversos estudos. A relação H:L aumentou em animais estressados por calor (JAHANIAN; RASOULI, 2015; ALTAN et al., 2003; ZULKIFLI et al., 2003).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre temperaturas de incubação e níveis de treonina, portanto, os dados foram analisados pelo teste de Tukey apenas para os fatores principais (temperatura e nível de treonina).

O tratamento de baixa temperatura de incubação apresentou maior ($P < 0,05$) número de heterófilos e relação heterófilo:linfócito, e menor ($P < 0,05$) número de linfócitos. No fator níveis de treonina, não houve diferença ($P > 0,05$) para os parâmetros sanguíneos avaliados. Esse resultado confirma novamente os resultados previamente apresentados, indicando que a presença da *Salmonella* é um fator estressante para as aves e que o estresse é aliviado em parte nos animais incubados em alta temperatura. Segundo Kogut et al. (1998), os heterófilos são células da família dos fagócitos, que desempenham uma importante função como mediadores da imunidade natural das aves.

No estudo de Moreira Filho et al. (2015), não foi avaliada a relação heterófilo:linfócito como indicador de estresse, mas a expressão da proteína de choque térmico de 70 kD (Hsp70) diminuiu no intestino das aves inoculadas com *Salmonella* quando estas haviam sido submetidas a alta temperatura de incubação ou nível elevado de treonina na dieta. A expressão de Hsp70 aumenta em tecido de animais estressados por calor, conforme descrito em diversos estudos. Segundo Liew et al. (2003), animais que apresentam aumento na expressão de HSP possuem não só maior tolerância ao

calor, como também maior resistência a doenças, e isso pode ser atribuído à maior expressão de Hsp70. Givisiez et al. (2003) ressaltam que o aumento da expressão de Hsp70 é um dos fatores que contribuem para melhoria da resposta dos animais pré tratados termicamente ao estresse térmico na fase pós-eclosão.

Apesar do indicador sanguíneo H:L mostrar que os animais desafiados estão estressados quando comparados com o grupo testemunha, os dados de microbiologia, morfometria e desempenho mostram que aves alimentadas com nível elevado de treonina e incubados em alta temperatura respondem melhor ao desafio do que aves incubadas em baixa temperatura e alimentadas com nível comercial (basal) de treonina. Esses dados mostram que o estresse térmico serviu como preparação para o estresse causado por *Salmonella*, conforme sugerido por Norup et. al (2008).

Tabela 8. Contagem de heterófilos, linfócitos e relação heterófilo:linfócito (H:L) de frangos Label Rouge (10d) submetidos a manipulação da temperatura de incubação e alimentados com diferentes níveis de treonina pós-eclosão. Os animais foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis aos dois dias de idade.

| Temperatura de Incubação | Heterófilo | Linfócito | H:L |
|---------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| Baixa | 20,9 ± 2,9 aA | 67,6 ± 5,2 bB | 0,31 ± 0,06 aA |
| Ideal | 15,4 ± 3,0 bB | 74,5 ± 7,2 abB | 0,22 ± 0,10 abA |
| Alta | 15,8 ± 3,9 bB | 76,8 ± 4,5 aA | 0,21 ± 0,05 bA |
| Testemunha | 10,4 ± 2,1 B | 85,0 ± 1,4 A | 0,12 ± 0,02 B |
| Níveis de Treonina | | | |
| Basal | 17,2 ± 4,7 aA | 73,1 ± 7,6 aB | 0,25 ± 0,02 aA |
| Elevada | 17,3 ± 5,2 aA | 72,9 ± 5,3 aB | 0,25 ± 0,09 aA |
| Testemunha | 10,4 ± 2,1 B | 85,0 ± 1,4 A | 0,12 ± 0,02 B |
| Temperatura (A) | <0,05 | <0,01 | <0,05 |
| Treonina (B) | NS | NS | NS |
| Interação (A x B) | NS | NS | NS |

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Dentro de cada fator, médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem do tratamento testemunha a 5% de probabilidade pelo teste Dunnet.

NS - Não significativo.

5 CONCLUSÕES

O efeito conjunto de treonina elevada com alta temperatura de incubação resultou em menor número de aves colonizadas com *Salmonella*, dentre as colonizadas, houve redução da contagem de colônias, e também atenuou a injúria intestinal causada por *Salmonella* Enteritidis, amenizando o impacto negativo sobre o desempenho.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.; RAM, S.J. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, v.11, p.36–42, 2004.
- ALTAN, O., A. PABUCCUOGLU, A. ALTAN, S. KONYALIOGLU, AND H. BAYRAK- TAR. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid per- oxidation and some stress parameters in broilers. **British Poultry Science**. v. 44, p. 545–550, 2003.
- ATENCIO, A.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO H. S.; OLIVEIRA, J. E.; VIEITES, F. M.; DONZELE, J. L. Exigências de treonina para frangos de corte machos nas fases de 1 a 20, 24 e 38 e 44 a 56 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n. 4, p. 880-893, 2004.
- AZZAM, M.M.M.; ZOU, X.T.; DONG, X.Y. et al. Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. **Poultry Science**, v.90, p.2251-2256, 2011.
- BAI, X.; LIU, X.; SU, Y. Inhibitory effects of intestinal mucus on bacterial adherence to cultured intestinal epithelial cells after surface burns. **Chinese Medical Journal**, v.113, p. 449–450, 2000.
- BAO, Y. M.; CHOCT, M. Dietary NSP nutrition and intestinal immune system for broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, 66:511-518, 2010.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, seção. 4, 2009. p. 435 - 454.
- BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C. et al. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v.75, p.5993-6007, 2007.
- CHADFIELD, M. S.; BROWN, D. J.; AABO, S.; CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Veterinary Microbiology**, v.20, n. 92, p. 49-64, 2003.
- COLLIN, A.; BERRI, C.; TESSERAUD, S. et al. Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.795–800, 2007.
- CORZO, A.; KIDD, A. T.; DOZIER, W. A. Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. **Journal of Applied Poultry Research**, v.16, p. 574-582, 2007.
- COX, N. A.; BERRANGE, M.E.; CASON, J.A. *Salmonella* penetration of eggs shells and proliferation in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v.79, p.1571-1574, 2000.

FAURE, M.; METTRAUX, C.; MOENNOZ, D. et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.1558-1564, 2006.

FAURE, M.; CHONE, F.; METTRAUX, C. et al. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1802-1807, 2007.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S. et al. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p.499-511, 2006.

GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGLAD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. Iowa State University Press, p. 583-599, 2003.

GIVISIEZ, P.E.N; FURLAN, R.L.; MALHEIROS, E.B. MACARI, M. Incubation and rearing temperature effects on Hsp70 levels and heat stress response in broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, p. 213-220, 2003.

GROSS, W. B., AND H. S. SIEGEL. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**. v. 27, p. 972–979, 1983.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.

HENSEL, M. *Salmonella* Pathogenicity Island 2. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 1015-1023, 2000.

JAHANIAN, R. RASOULI, E. Dietary chromium methionine supplementation could alleviate immunosuppressive effects of heat stress in broiler chicks. **Journal of Animal Science**. v. 93, p. 3355-3363, 2015.

KOGUT, M.H.; LOWRY, K.; MOYSES, R.B. et al. Lymphokine-augmented activation of avian heterophils. **Poultry Science**, Champaign, v.77, p.964-971, 1998.

LAW, G.K.; BERTOLO, R.F.; ADJIRI-AWERE, A. et al. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.292, p.1293-1301, 2007.

LE BELLEGO, L.; NOBLET, J. Performance and utilization of dietary energy and amino acids in piglets fed low protein diets. **Livestock of Production Science**, v.76, p.45-58, 2002.

LIN H, JIAO HC, BUYSE J, DECUYPERE E. Strategies for preventing heat stress in poultry. **Worlds Poultry Science J** 62:71–86. 2006.

LIEW, P.K.; ZULKIFLI, I.; HAIR-BEJO, M.; OMAR, A. R.; ISRAF, D. A. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heat shock protein 70 expression, resistance to infectious bursal disease, and growth in male broiler chickens subjected to heat stress. **Poultry Science**, v.82, p.1879-1885, 2003.

LOURENS, A.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M.J. et al. Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. **Poultry Science**, v.86, p.2194 – 2199, 2007.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP/FAPESP, 2002. 375p.

MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo de incubação**. 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. p. 121, 122, 183.

MAIORKA, A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; SANTIN, E., BORGES, A. S.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v 52, p. 487-490, 2000.

MAIORKA, A. Efeito da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal. 2002.

MAIORKA, A.; SILVA, A. V. F. da; SANTIN, E.; PIZAURO Jr, J. M.; MACARI, M. Broiler breeder age and dietary energy level on performance and pâncreas lipase and trypsin activities of 7-days old chicks. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 3, n. 3, p. 234-237, 2004.

MOREIRA FILHO, A. L. B. Estresse térmico embrionário e níveis de treonina sobre a resposta de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). 50 p. Areia-PB, Universidade Federal da Paraíba, 2014.

MOREIRA FILHO, A. L. B.; OLIVEIRA, C. J. B.; OLIVEIRA, H. B.; CAMPOS, D. B.; GUERRA, R. R.; COSTA F. G. P.; GIVISIEZ, P. E. N. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* enteritidis inoculation in broiler chicks. **Plos One**. v.10, p., 2015.

MORGAN, E. *Salmonella* Pathogenicity Islands. In: Rhen, M.; Maskell, D.; Mastroeni, P.; Threlfall, J. **Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis**. 1. ed. Londres: Horizon Bioscience, 2007. cap. 4, p. 67-88.

MORTOLA, J.P. Metabolic response to cooling temperatures in chicken embryos and hatchlings after cold incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.145, p.441-448, 2006.

NORUP, L.R.; JENSEN, K.H.; JORGENSEN, E.; SORENSEN, P.; JULL-MADSEN, H.R. Effect of mild heat stress and mild infection pressure on immune responses to an *E. coli* infection in chickens. **Journal Animal Science**, v.2, p.265-274, 2008.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Nutrição e status imunológico de frangos de corte. in: II congresso latino-americano de nutrição animal (II CLANA), 2006, São Paulo. Anais..., São Paulo: CBNA/AMENA, 2006. p.1-25.

PIAIA, J.C.Z. Aplicação da inteligência artificial no monitoramento do processo de incubação. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PIESTUN, Y.; SHINDER, D.; RUZAL, M. et al. Thermal manipulations during broiler embryogenesis: effect on the acquisition of thermotolerance. **Poultry Science**, v.87, p.1516–1525, 2008.

ROSTAGNO, H.S. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia,. 186p. 2011.

SANTOS, E. G. Resposta Contra *Salmonella* Enteritidis em Aves de Diferentes Genótipos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). 38 p. Areia-PB, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.V.; MARTINS, T.D.D.; FIGUEIREDO-LIMA, D.F.; MACARI, M.; OLIVEIRA, C. J. B.; GIVISIEZ, P.E.N. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella* Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.1158–1165, 2013.

SHARIFI, A.R.; HORST, P.; SIMIANER, H. The effect of naked neck gene and ambient temperature and their interaction on reproductive traits of heavy broiler dams. **Poultry Science** 89:1360–1371, 2010.

SILVA, M. A. N. et al. Resistência ao estresse calórico em frangos de pescoço pelado. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, n.1, v.3, p. 27-33, 2001.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, p.85-100, 2002.

SILVA, E. N. Doenças de transmissão vertical. In: Manejo da incubação. MACARI, M.; GONZALES, E. (eds.). FACTA. Campinas, SP., Brasil. p. 378-393, 2003.

SMITH, A.L.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**. Academic Press, London, 2008, cap.13, p. 43–271.

SOUZA JÚNIOR, J. B. F. Termorregulação e produção de ovos de galinhas Label Rouge em ambiente equatorial semiárido. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semiárido. 2012. 11p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semiárido.

SPOLAORE, A. J. G. Prevalência de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do Paraná e potencial de disseminação em bandejas, facas e luvas de manipuladores durante a inspeção post-mortem. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. 59 p.

STAR, L.; JUUL-MADSEN, H.R.; DECUYPERE, E. et al. Effect of early life thermal conditioning and immune challenge on thermotolerance and humoral immune competence in adult laying hens. **Poultry Science**, v.88, p.2253–2261, 2009.

STERZO, E.V.; VARZONE, J.R.M.; FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.12, p.129-138, 2008.

STOLL, B.; HENRY, J.; REEDS, P.J.; YU, H.; JAHOOOR, F.; BURRIN, D.G. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential-amino acids in milk protein fed piglets. **Journal of Nutrition**, v.128, p.606-614, 1998.

STROBER, W.; FUSS, I.J.; BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Reviews in Immunology**, v.20, p.495-549, 2002.

TAKAHASHI, S.E. Efeito do sistema de criação sobre o desempenho e a qualidade de carne de frangos de corte tipo colonial e industrial. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2003. 64p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista, 2003.

TON, A. P. S. Exigência de Treonina e triptofano digestível para codornas de corte. 2010. 109 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual de Maringá. Paraná.

TZSCHENTKE, B. Attainment of thermoregulation and its influence by environmental factors. **Poultry Science**, v. 86, p.1025-1036, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, Assistat versão 7.6 beta. 2012.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 60, n. 1, p. 101-111, 2004.

WALSTRA, I.; TEN NAPEL, J.; KEMP, B. et al. Temperature manipulation during layer chick embryogenesis. **Poultry Science**, v.89, p.1502-1508, 2010.

WANG, X.; QIAO, S. Y.; LIU, M.; MA, Y. X. Effects of graded levels of true ileal digestible threonine on performance, serum parameters and immune function of 10–25 kg pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, p.264-278, 2006.

YAHAV, S.; COLLIN, A.; SHINDER, D. et al. Thermal manipulations during broiler chick embryogenesis: effects of timing temperature. **Poultry Science**, v.83, p.1959-1963, 2004.

ZAEFARIAN, F.; ZAGHARI, M.; SHIVAZAD, M. The threonine requirements and its effects on growth performance and gut morphology of broiler chicken fed different of protein. **International Journal of Poultry Science**, v.12, p. 1207-1215, 2008.

ZULKIFLI, I., P. K. LIEW, D. A. ISRAF, A. R. OMAR, AND M. HAIR-BEJO. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heterophil to lymphocyte ratios, heat shock protein 70 expression and body temperature of heat-stressed broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**. v. 28, p.217–222, 2003.